

신전(stretch)에 의한 자발성 자궁근
수축 빈도 및 장력의 변화 기전

연세대학교 대학원

의학과

김 정 연

신전(stretch)에 의한 자발성 자궁근 수축 빈도 및 장력의 변화 기전

지도교수 조 동 제

이 논문을 박사 학위 논문으로 제출함

2008년 12월

연세대학교 대학원

의학과

김 정 연

김정연의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

연세대학교 대학원

2008년 12월

감사의 글

정들었던 산부인과학 교실을 떠나 개업의 길로 나서면서 학업을 지속하기가 매우 어려웠습니다. 그러나 의과대학 시절부터 인턴, 레지던트, 강사, 개업의 시절까지 늘 곁에서 지켜봐 주시고 의술과 인술을 겸비한 산부인과 의사의 길을 밝혀주셨으며, 또한 본 논문이 완성되기까지 끊임없는 관심과 지도, 편달을 주신 조 동제 교수님께 깊은 감사드립니다. 아울러 본 논문의 이론적 배경과 실험, 결과의 산출과 해석까지 거의 모든 부분을 도맡아주신 생리학 교실의 안 덕선 교수님께 머리 숙여 감사드립니다. 어려운 생리학의 이론을 조목조목 설명해주시며 여러 가지 부족한 저에게 학문적 가르침을 주신 안 덕선 교수님께서 계시지 않았다면 이 논문은 존재하지 않았을 것입니다. 다시 한번 진심으로 감사 드립니다. 또한 해외학회에서 처음 뵈었던 서울대 의대 산부인과학 교실 최 영민 교수님께서 본 논문의 지도교수로 여러 가지 조언, 지도를 해주신 점 너무나 감사드립니다. 항상 먼 길을 마다하지 않고 달려와 주시고 제게 크나큰 힘을 주셔서 다시 한번 고개 숙여 감사드립니다. 그리고 학문적 조언과 지도를 해주신 해부학 교실의 박 형우 교수님, 논문 완성까지 꼼꼼하게 보아주신 마취과학 교실의 윤 덕미 교수님, 논문 수정과 정리에 도움주신 이 윤정 선생님께도 진심으로 감사드립니다. 마지막으로 오늘이 있기까지 늘 격려와 사랑을 주신 부모님과 항상 옆에서 지켜 보아준 사랑하는 아내, 딸 유경에게도 깊은 감사를 드립니다.

저 자 씀

차 례

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	
1. 장력 측정	6
2. 단일 자궁 평활근 세포의 분리	7
3. 신전에 의해 활성화되는 이온 전류의 측정	8
4. 실험 용액 및 약물	9
III. 결과	
1. 장력 변화가 자궁 평활근의 자발적 수축 빈도에 미치는 효과	11
2. 자궁 평활근 세포에서 신전 자극에 의해 활성화되는 이온 전류의 존재	14
3. 신전 자극에 의해 활성화되는 이온 통로의 특성	16
IV. 고찰	
1. 자궁 평활근의 길이 변동과 자발적 수축 빈도 변화 사이의 관계	23
2. 신전 자극에 의해 활성화되는 비특이적 양이온 통로	24
3. 신전 자극에 의해 활성화되는 이온 통로의 생리적 역할	27
V. 결론	28
참고문헌	30
영문요약	34

그림 차례

Figure. 1. Block diagram for tension measurement	7
Figure. 2. Schematic diagram for measurement of ionic current	9
Figure 3. Effect of stretch on uterine contraction	12
Figure 4. Effect of Gd^{3+} and flufenamic acid on stretch-induced spontaneous uterine contraction	13
Figure 5. Effect of flufenamic acid on swelling-induced current in uterine smooth muscle cell	15
Figure 6. Relation between channel activity and the magnitude of negative pressure within microelectrode	17
Figure 7. Voltage dependence of stretch-activated channel	18
Figure 8. Ionic selectivity of stretch activated channel in uterine smooth muscle cells	20
Figure 9. Anion permeability of stretch activated channel in uterine smooth muscle cells	21
Figure 10. Intracellular $[Ca^{2+}]$ -dependent facilitation of SA channel activity	22

국문 요약

신전(stretch)에 의한 자발성 자궁근 수축 빈도 및 장력의 변화 기전

임신 말기에 분만이 유도되는 정확한 기전에 대해서는 아직 명확하지는 않지만, 다태아 임신이나 양수과다증(polyhydramnios)과 같이 정상 임신에 비해 자궁의 크기가 과도하게 증가한 경우, 분만이 조기에 일어난다는 보고나 분리한 자궁평활근 절편에서 자발적 수축이 발생하는 빈도가 자궁근 절편에 가해지는 신전 정도에 비례하여 증가한다는 보고 등으로 보아, 태아의 성장에 따른 자궁의 확대, 즉 자궁근에 가해진 신전(stretch) 자극이 자궁근의 자발적 수축을 유도하는 중요한 인자의 하나로 생각된다. 그러나 자궁근의 신전이라는 기계적 자극이 어떤 인자를 매개로 하여 자궁근의 수축 빈도 및 장력 변화로 연결되는지에 대해서는 명확히 밝혀진 바 없다. 따라서 본 연구에서는 자궁 평활근 절편 및 단일 평활근 세포를 이용하여 신전 자극에 의해 활성화되는 이온 통로 (stretch-activated ion channel, SA 통로)의 존재 및 그의 특성을 patch clamp 방법을 사용하여 직접적으로 확인하고자 하였다. 실험을 통해 얻은 결과는 다음과 같다.

1. 자궁 평활근의 자발적 수축 빈도는 자궁근의 신전 정도에 비례하여 증가하였으며, SA 통로 차단제 투여 시, 투여 농도에 비례하여 자발적 수축 빈도가 감소하는 것을 관찰할 수 있었다.
 2. 저삼투성 용액으로 자궁평활근 세포를 관류시켜 세포의 팽창을 유도한 경우, 이온 전류가 발생하였으며, 이같은 효과는 SA 통로 차단제인 flufenamic acid 처리 시 억제되었다.
 3. Inside-out patch 상태에서 전극 내부에 음압을 가하여 patch membrane을 신전시키는 경우 SA 통로가 활성화되었으며, 이 통로의 활성 정도는 전극 내부에 가한 음압의 크기와 막전압의 탈분극 정도에 비례하여 증가하였다.
 4. 열려 있는 SA 통로를 통해서 Na, K, Cs과 같은 일가 양이온들이 거의 동일한 투과도 특성을 보였으며, Cl와 같은 음이온은 통과하지 못하였다.
 5. 세포 내액의 Ca 농도 증가 시 SA 통로의 활성이 현저히 증가하였다.
- 이상의 실험 결과로 볼 때 자궁 평활근 세포막에 신전 자극에 반응하여 그의

활성이 증가하는 SA 통로가 존재함을 확인할 수 있었고, 이같은 SA 통로의 활성화 변화가 임신 말기에서 관찰되는 자궁 평활근의 자발적 수축 빈도 증가를 초래하는 중요한 기전의 하나라고 생각된다. 또한 다태아 임신이나 양수과다증 환자에서 관찰되는 조기 분만 현상 역시 SA 통로의 과도한 활성화가 주요 원인의 하나라고 생각된다.

핵심되는 말: 자궁 평활근 세포, stretch-activated channel, flufenamic acid, spontaneous uterine contraction

신전(stretch)에 의한 자발성 자궁근 수축 빈도 및 장력의 변화 기전

<지도교수 조동제>

연세대학교 대학원 의학과

김 정 연

I. 서 론

자궁 평활근에서 자발적인 수축(spontaneous phasic contraction)이 일어나는 빈도와 수축력의 크기는 임신 주수에 따라 커다란 영향을 받는다.¹ 임신 초기 및 중기의 자궁 평활근에선 자발적인 수축이 거의 관찰되지 않지만 임신 말기가 되면서 자발적 수축의 빈도와 크기가 증가함으로써 분만이 유도된다.² 임신 말기에 분만이 유도되는 정확한 기전에 대해서는 아직 명확하지는 않지만, 태아의 성장에 따른 자궁근의 신전(stretch)이 중요한 역할을 함이 많은 연구자들에 의해 보고되었다.³⁻⁵ 예를 들어 다태아 임신이나 양수과다증(polyhydramnios)과 같이 정상에 비해 자궁근의 신전이 과도하게 일어난 경우 흔히 조기 분만 (premature labor)이 발생한다는 보고^{6,7} 등은 자궁근의 신전이 자궁평활근의 수축 양상 조절에 중요한 역할을 수행하고 있음을 시사하나 어떤 과정을 통해 자궁의 신전이 자궁 평활근의 자발적 수축 빈도와 수축력을 증가시키는지에 관해선 아직 명확하게 밝혀진바 없다. 다만 여러 종류의 세포에서 신전 자극 시 막전압의 탈분극이나 장력 증가 현상이 나타나며,⁸⁻¹⁰ 자궁 평활근의 경우에도 신전 자극에 의해 막전압의 탈분극과 활동전압의 생성이 유도된다는 보고¹¹ 등으로 볼 때 신전 자극이 자궁근의 자발적 수축 현상에 매우 중요한 역할을 함을 알 수 있다.

현재까지 자궁근의 자발적 수축이 일어나는 자세한 기전에 대해서는 아직 명확히 규명되지는 않았지만, 어떤 원인에 의해서든지 자궁 평활근 세포의 안정막 전압이 서서히 탈분극되는 경우 (slow depolarization), 이에 의해 닫혀 있던 막전압 의존적 Ca^{2+} 통로가 열리게 되고, 이를 통해 Ca^{2+} 이온이 세포 내로 유입되면서 가시전압 (spike discharge)이 발생하는 동시에 세포 내 Ca^{2+} 농도가 증가함으로써 자궁근의 수축이 유발되게 된다. 이때 외부에서 전기 자극 등을 통해 안정막 전압이 탈분극되는 속도(slope of slow depolarization)를 변화시키는 경우 그에 비례하여 자궁근의 수축 빈도가 변화된다는 보고 등은 안정막 전압의 탈분극 속도에 영향을 주는 인자들이 자궁 평활근의 자발적 수축 빈도 조절에 관여함을 시사한다.¹²⁻¹⁴

이같이 자궁 평활근의 수축 빈도 조절에 중요한 역할을 한다고 생각되는 평활근 세포의 막전압 값은 세포 내로 유입되는 양이온 및 음이온, 그리고 세포 외로 배출되는 양이온 및 음이온의 총량에 의해 결정된다. 만약 어떤 원인에 의해서든지 세포 내로 유입되는 양이온의 양이 증가하거나 혹은 세포 외로 배출되는 음이온의 양이 증가한다면 안정막 전압 값의 변화와 더불어 자궁 평활근의 자발적 수축 빈도에 변화를 초래할 수 있을 것이다. 따라서 신전 자극 시 관찰되는 자궁 평활근의 자발적 수축 빈도의 증가 현상 역시 신전 자극에 의한 자궁 평활근의 탈분극 효과에 의해 초래되었을 가능성이 있으나 어떤 기전을 통해 자궁평활근 세포막전압의 탈분극이 유발되는지에 대해서는 아직 명확히 밝혀지지 않은 상태이다.

세포막을 신전시키는 경우, 그에 의해 활성화되는 이온 통로 (stretch-activated ion channel, SA 통로)의 존재가 골격근 세포에서 처음 보고된 이래 난자, 적혈구, 내이 모세포 (inner hair cell), 평활근 세포 등의 다양한 종류의 세포에서 이의 존재가 확인되었다.¹⁵⁻¹⁸ SA 통로의 경우, 열려 있는 이온 통로를 통해 양이온들이 자유롭게 이동할 수 있는 비

특이적 양이온 통로(nonselective cation channel)의 특성을 갖고 있다.^{15,18} 따라서 자궁 평활근 세포막에 SA 통로가 존재하고, 이의 활성이 자궁근의 신전에 의해 증가한다면 안정막 전압이 탈분극되는 속도를 증가시켜 자궁근의 수축 빈도를 증가시킬 가능성이 있으나 이에 대한 직접적인 보고는 없는 실정이다. 즉 자궁근의 신전 정도에 따라 자발적 수축이 발생하는 빈도가 증가하는 것은 보고된 바 있으나,⁵ 과연 자궁 평활근 세포막에 SA 통로가 존재하는지, 그리고 신전에 의한 자발적 수축 빈도 증가 현상에 SA 통로의 활성 변화가 실질적으로 관여하는지 등에 대해서는 아직까지 보고된 바 없다.

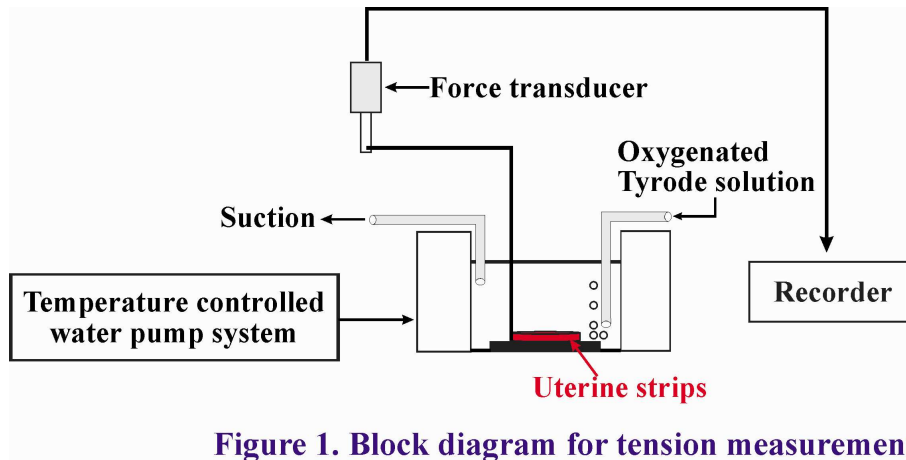
따라서 본 연구에서는 분리한 자궁 평활근 절편 및 단일 평활근 세포를 이용해서 자궁 평활근 세포막에 신전에 의해 활성화되는 이온 통로가 존재하는 지를 확인하고, 이 통로의 활성 변화가 자궁근의 수축 빈도 변화에 연관이 있는 지를 조사하고자 하였다. 즉 1) patch clamp 방법을 이용해서 신전에 의해 활성화되는 이온 통로의 투과도 및 gating 특성 등을 직접 측정함으로써 신전에 의해 활성화되는 이온 전류가 기존의 막전압 의존성 통로, 예를 들어 Ca^{2+} 통로나 Cl^- 통로 등의 활성이 신전에 의해 변화하여 나타난 것인지, 혹은 신전 자체에 의해 활성화되는 비특이적 양이온 통로에 의해 나타난 것인지를 확인하고자 하였다. 또한 2) 기존에 보고된 여러 종류의 SA 통로 차단제 중에서 자궁평활근의 SA 통로에 선택적으로 작용하는 차단제를 확인한 후, 이들 약물이 자궁 평활근의 자발적 수축 빈도에 미치는 효과를 관찰함으로써 자궁평활근 세포막에 존재하는 SA 통로가 실질적으로 자궁 수축 빈도 조절에 관여하는 지를 확인하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 장력 측정

임신 18~20 일째의 쥐 (Sprague-Dawley rat) 자궁평활근 절편을 다음과 같은 방법으로 제작하였다. 경추 탈골로 쥐를 희생시킨 후 자궁을 적출하였다. 적출한 자궁을 100% O₂로 포화시킨 정상 Tyrode 용액에 담근 후 수술 현미경하에서 자궁 조직 주위의 응고된 혈액과 결체 조직을 안과용 미세가위 및 핀셋을 이용하여 제거하였다. 이후 자궁 평활근의 longitudinal layer만을 분리한 후 이를 절편 형태 (길이 3~4mm, 폭 1mm)로 만들어 장력 측정에 사용하였다.

아래 Figure 1과 같이 자궁 평활근 절편의 한쪽 끝은 측정 용기 바닥에, 다른 한 끝은 strain gauge transducer (Harvard, Holliston, MA, USA)에 고정하여 장력의 변화를 측정할 수 있도록 하였다. 조직 절편에 1g의 안정장력을 가한 상태에서 자발적 수축 반응의 크기와 빈도가 일정해질 때까지 기다린 후 실험을 실시하였다. 신전이 자궁근의 수축 빈도에 미치는 효과를 관찰하기 위해 자궁근 절편에 아무런 장력을 가하지 않았을 때의 절편의 크기를 100%로 한 상태에서, 절편의 길이를 각각 150%, 200%, 250%, 300%로 늘린 상태에서 각각 자궁근의 수축 빈도와 장력의 크기 변화를 관찰하였다. 이후 SA 통로 길항제로 알려진 Gd³⁺, flufenamic acid, SKF 96365 등의 약물을 관류액에 투여하여 이들이 수축 빈도 및 장력의 크기 변화에 미치는 효과를 관찰하였다.



2. 단일 자궁 평활근 세포의 분리

자궁 평활근 조직 절편을 미세가위로 잘게 잘라 길이와 폭이 1mm 정도 되는 조직 절편을 제작한 후 이를 37°C의 Ca^{2+} -free Tyrode 용액에서 10분간 배양하여 조직 표면에 존재하는 Ca^{2+} 의 양을 최소화하였다. 이후 배양액 내에 collagenase(3mg/ml), trypsin inhibitor (0.33 mg/ml), DTT (0.33 mg/ml), papain (0.033 mg/ml), 1% bovine serum albumin, 50 μM CaCl_2 를 첨가한 후 35°C에서 30분간 배양하였다. 배양이 끝난 후 조직 절편이 포함된 배양액을 500 G로 1분간 원심 분리하여 조직 절편 및 평활근 세포가 침전되도록 한 후 상층액을 조심스럽게 제거하였다. 이후 동량의 KB 용액을 첨가하여 잘 흔들어서 세포부유액을 만든 후 다시 원심분리를 시행하였다. 이 같은 과정을 2-3회 반복하여 세포부유액 내에 존재하는 collagenase 등을 제거한 후 유리 대통을 이용하여 조직 절편을 조심스럽게 흔들어주어서 단일 평활근 세포가 자궁근 절편에서 유리되도록 하였으며, 실험에 사용하기 전까지 4°C에서 냉장 보관하였다.

3. 신전에 의해 활성화되는 이온 전류의 측정

소량의 평활근 세포 부유액을 실험 용기에 떨어트린 후 약 5-10 분 정도 기다려서 평활근 세포가 실험 용기 바닥에 부착하도록 한 후 실험을 실시하였다. 실험 용액은 중력에 의해 1ml/min의 속도로 관류되도록 하였으며, 특별한 온도 조절 없이 상온(25°C)에서 실험을 수행하였다. 실험에 사용한 유리미세전극 (Sutter Co. Novata, CA, USA)은 전극 내액을 채웠을 때 전극 저항이 2-3 MΩ이 되도록 vertical puller (Narishige Co. Tokyo, Japan)의 출력을 조정하여 작성하였다.

자궁 평활근 세포막을 통한 이온 이동량의 변화는 Hamil 등¹⁹의 방법을 이용하여 아래와 같이 기록하였다. 즉 아래 Figure 2와 같이 유리미세전극을 평활근 세포막 표면에 부착시킨 후, 유리미세전극 내부의 세포막을 터트려 전극 내액과 세포 내액이 서로 교통하는 상태 (whole cell mode)를 만들거나 또는 세포막이 붙어있는 상태로 유리미세전극을 세포에서 떨어트린 상태 (inside-out patch mode)에서 세포막의 신전에 의해 활성화되는 이온 전류의 존재 여부와 그의 특성을 측정하였다. 이때 세포막을 신전시키는 방법으로 whole cell mode에선 관류액의 삼투질 농도를 300 mosm에서 각각 260mosm 및 220mosm으로 낮추어주었으며, inside-out patch 상태에선 유리미세 전극 내부의 압력을 water manometer와 연결된 주사기를 이용하여 일정한 크기의 음압 (negative pressure)으로 유지함으로써 patch membrane의 신전 정도를 조절하였다. 세포막 신전에 의해 활성화되는 이온 전류는 pClamp 증폭기 및 analogue-digital converter (digidata 1200, Axon Inc. Foster city, CA, USA)를 거쳐 컴퓨터에 저장한 후 분석하였다. 각각의 경우에 따른 막전압 고정 방법과 관류액의 조성 등은 Figure 설명에 따로 기술하였다.

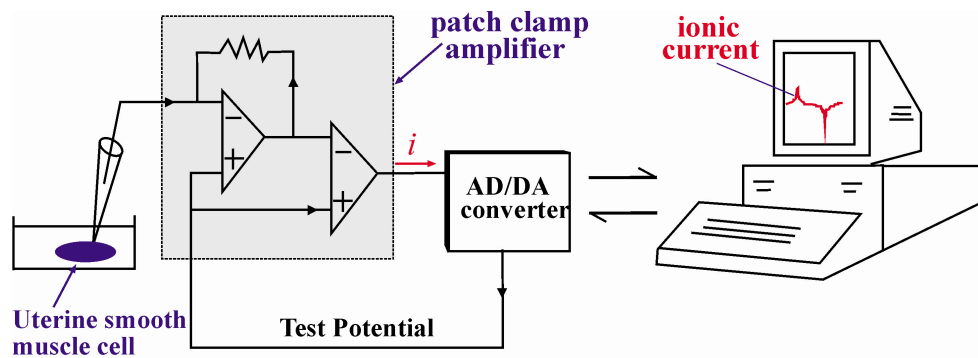


Figure 2. Schematic diagram for measurement of ionic current

4. 실험 용액 및 약물

자궁 평활근 절편 작성 시 사용한 정상 Tyrode 용액의 조성은 다음과 같다.(mM): NaCl 140, KCl 5.6, CaCl_2 2.5, MgCl_2 1.2, HEPES 10, Glucose 10, pH = 7.4 with Tris. 및 단일 평활근 세포를 분리하기 위해 Ca^{2+} -free Tyrode 용액 및 KB 용액을 사용하였는데, Ca^{2+} -free Tyrode 용액은 위의 Tyrode 용액 조성에서 CaCl_2 및 MgCl_2 를 제거하여 작성하였으며, KB 용액의 조성은 다음과 같다 (mM; KCl 20, KH_2PO_4 10, glucose 10, L-glutamic acid 70, β -hydroxybutyric acid 10, taurine 10, EGTA 0.5, albumin 1%).

Whole cell mode에서 사용한 전극 내액의 기본 조성은 다음과 같다. (mM; CsCl 140, MgCl_2 1; EGTA 10, HEPES 10, pH=7.4 with CsOH). 자궁 평활근 세포막을 신전시키는 실험에서 사용한 관류액 중 대조군 용액의 조성은 다음과 같다 (mM; CsCl 120 or 100, MgCl_2 1, EGTA 10, HEPES 10, sucrose 40 or 80, pH=7.4 with CsOH). 저삼투성 용액 (260mosm 및 220mosm 용액)은 위의 관류액의 조성에서 sucrose를 제거하여 작성하였고, 용액의 삼투질 농도는 osmometer를 이용하여 검정하

였다. 이를 통해 용액의 Cl^- 이온의 농도 변화가 junction potential에 미치는 효과를 최소화하였다.

Inside-out patch mode에서 SA 통로의 활성을 측정할 때 사용한 관류액 및 전극 내액의 조성은 다음과 같다. (mM; CsCl 140, MgCl_2 1; EGTA 10, HEPES 10, pH=7.4 with CsOH). SA 통로의 상대적 이온 투과도 (relative ionic permeability)를 측정하기 위해 관류액의 CsCl을 동량의 NaCl 및 KCl로 각각 치환한 상태에서 실험을 실시하였으며, KCl을 사용한 경우에는 전극 내액에 100nM의 iberiotoxin을 첨가하여 Ca^{2+} 의존성 K^+ 통로가 기록되는 것을 차단하였다. 세포 내 Ca^{2+} 농도 변화가 SA 통로 활성화에 미치는 영향을 확인하기 위해 관류액의 Ca^{2+} 농도를 각각 pCa 5, 6, 7, 8, <9 로 유지한 상태에서 실험을 실시하였다. 이때 용액의 Ca^{2+} 농도를 변화시키기 위해 첨가한 CaCl_2 와 EGTA의 양은 컴퓨터 프로그램 (Maxchelator)을 이용하여 산출하였다. 실험에 사용한 모든 시약은 Sigma 회사(Sigma Co, Mo, USA) 제품을 사용하였다.

III. 결 과

1. 장력 변화가 자궁평활근의 자발적 수축 빈도에 미치는 효과

자궁 평활근에서 관찰되는 자발적인 수축(spontaneous phasic contraction) 현상에 자궁 평활근의 신전이 미치는 효과를 확인하기 위해 자궁평활근의 안정 시 길이를 달리한 상태에서 자발적 수축이 생성되는 빈도를 확인하였다. 자궁 평활근 절편을 장력 측정용 실험 장치에 위치시킨 후, 평활근 절편에 장력을 전혀 가하지 않은 상태에서의 길이를 수술 현미경 하에서 측정하여 이를 초기 값으로 삼았다. 이후 평활근 절편의 길이를 초기 값의 1.5배에서 3.5배까지 늘려준 상태에서 자발적 수축의 발생 빈도와 수축력의 변화를 측정하였다. Figure 3에서 볼 수 있듯이 자궁 평활근의 길이를 증가시키는 경우 그에 비례하여 자발적 수축의 발생 빈도와 수축력이 증가하는 것을 관찰할 수 있었으며, 초기 값의 3배의 길이로 늘려준 경우 자발적 수축의 빈도 및 수축력의 크기가 최대에 도달하는 것을 관찰할 수 있었다.

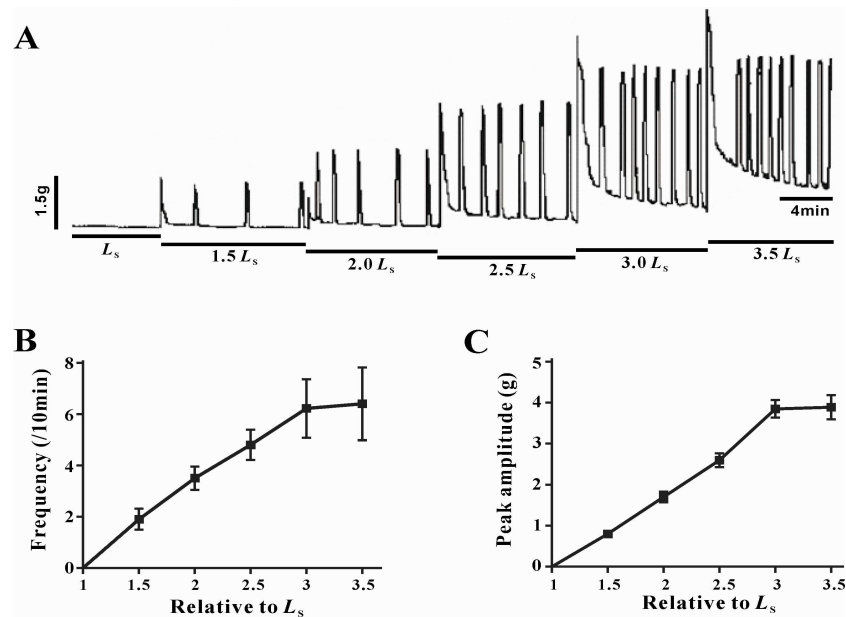


Figure 3. Effect of stretch on uterine contraction.

A: Representative trace of stretch-induced changes in spontaneous contraction frequency and amplitude. The length of uterine strip was gradually increased to 3.5 times of initial, slack length of strip (L_s). Summarized effect of stretch on spontaneous contraction frequency (B) and peak amplitude (C), (n = 10).

자궁 평활근의 길이 변동에 따른 수축 빈도의 변화가 신전 자극에 의해 활성화되는 SA 통로에 의한 것인지를 확인하기 위해 자궁 평활근 절편의 길이를 초기 길이의 2.5배로 늘린 상태에서 자궁 평활근의 자발적 수축 빈도와 장력을 측정하여 이를 대조군으로 삼았다. 이후 SA 통로 차단제로 알려진 gadolinium (Gd^{3+})과 flufenamic acid (FFA)를 관류액에 첨가하여 이들 약물이 자궁 평활근의 자발적 수축에 미치는 효과를 확인하였다. Figure 4에 나타낸 바와 같이 Gd^{3+} 와 FFA 처리 시, 농도 의존적으로 자발적 수축의 발생 빈도가 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (IC_{50} of Gd^{3+} & FFA = $2.6 \pm 0.1 \mu M$ & $4.4 \pm 0.1 \mu M$, respectively, n = 7).

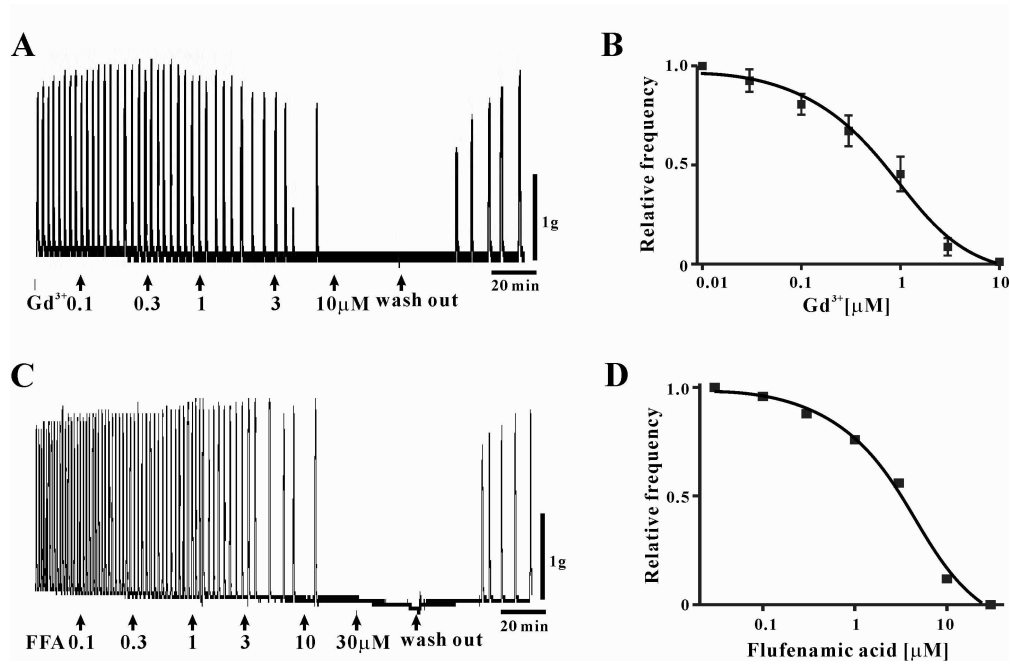


Figure 4. Effect of Gd^{3+} and flufenamic acid on stretch-induced spontaneous uterine contraction.

A. Representative trace for the effect of Gd^{3+} on stretch-induced spontaneous uterine contraction, B. Concentration response curve for Gd^{3+} . The changes in the frequency of spontaneous contraction are expressed relative to control. Data points are mean \pm SD, (n = 7). The solid curve shows the best fit to the Hill function. C, D as for A and B, but with flufenamic acid (FFA), (n = 7).

2. 자궁 평활근 세포에서 신전 자극에 의해 활성화되는 이온 전류의 존재

관류액의 삼투질 농도를 감소시키는 경우, 그에 비례하여 이온 전류의 활성이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. Figure 5에서 나타낸 바와 같이 관류액의 삼투질 농도를 300mosm에서 260mosm 및 220mosm으로 감소시키는 경우, 삼투질 농도 감소에 비례하여 막전류의 크기가 유의하게 증가하는 것을 관찰할 수 있었다 ($n = 6$). 등삼투성 용액으로 자궁 평활근 세포를 관류 시 막전압의 크기에 거의 직선적으로 비례하는 leak current를 얻을 수 있었는데 비해, 저삼투성 용액으로 세포를 관류하여 얻은 막전류는 막전압의 탈분극 정도에 비례하여 그 크기가 증가하는 outward going rectification 현상을 관찰할 수 있었다. 이 같은 막전압 의존 특성은 저삼투성 용액에 의해 유발된 전류에서 등삼투성 용액으로 관류하였을 때 관찰된 전류를 subtract해준 경우 좀 더 뚜렷하게 확인할 수 있었다 (Figure 5-B).

저삼투성 용액 관류에 의해 활성화되는 이온 전류가 세포막의 신전에 의해 활성화되는 이온 전류인지를 확인하기 위해 관류액에 SA 통로 차단제로 알려진 flufenamic acid를 투여하여 그의 효과를 관찰하였다. Figure 5-C에서 볼 수 있듯이 flufenamic acid 투여 시, 투여 농도에 비례하여 이온 전류의 크기가 현저하게 억제되는 것을 관찰할 수 있었으며, 저삼투성 용액에 의해 활성화된 이온 전류의 50%를 억제하는 (half maximal inhibition dose, IC_{50}) flufenamic acid의 용량은 $7.0 \pm 0.9 \mu M$ 이었다 ($n=6$).

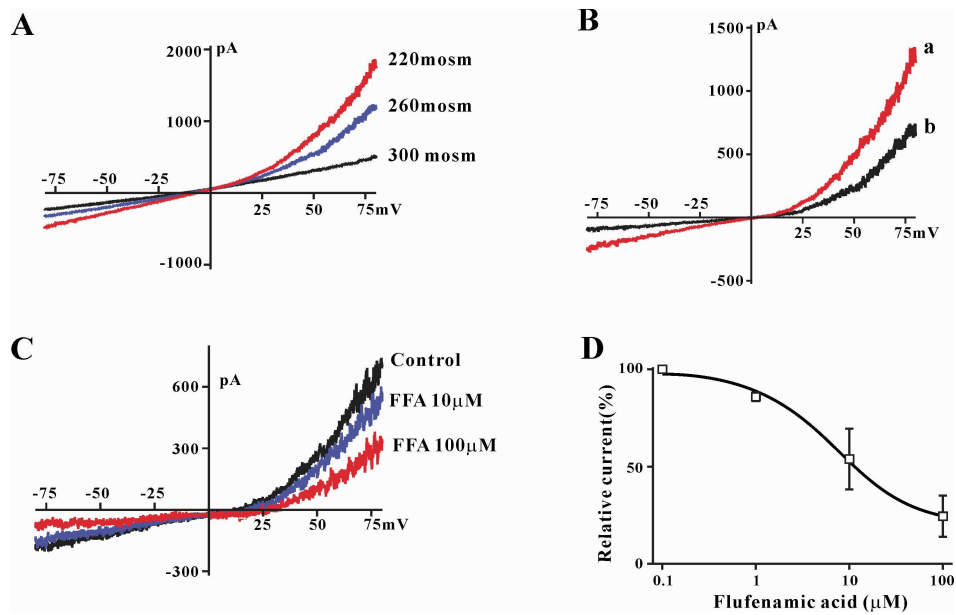


Figure 5. Effect of flufenamic acid on swelling-induced current in uterine smooth muscle cells.

A: I-V relationship of current in response to ramp pulse from -80 mV to +80 mV before and during perfusion of hypoosmotic solutions. B. Swelling activated currents were obtained by subtraction of hypoosmotic solution-induced current to control current (acquired during perfusion of iso-osmotic solution). a; subtracted current from 220mosm-induced current to 300mosm-induced current, b; subtracted current from 260mosm-induced current to 300mosm-induced current. C. Representative trace for the effect of flufenamic acid on swelling activated current. Control means the current which was activated by perfusion of 220 msom solution. FFA means flufenamic acid. D. Concentration response curve for flufenamic acid. Current amplitude were measured at -60mV and expressed relative to the control current. The data points are mean \pm SD. The solid curve shows the best fit to the Hill function. Half-maximal inhibition of flufenamic acid is 7.0 ± 0.9 μ M, (n = 6).

3. 신전 자극에 의해 활성화되는 이온 통로의 특성

저삼투성 용액 관류 시 활성화되는 이온 전류가 어떤 이온 통로의 활성화 변화를 통해 유발되는지를 확인하기 위해 자궁 평활근 세포막의 일부(patch)를 이용하여 실험을 실시하였다. Figure 6에 나타낸 바와 같이 유리미세 전극 내부에 음압을 가한 경우, 음압의 크기에 비례하여 이온 통로의 열리는 정도가 증가하는 것을 관찰할 수 있었으며, 유리미세 전극 내부에 가한 음압을 제거하는 경우 열렸던 이온 통로가 불활성화되는 것을 확인할 수 있었다. 유리미세 전극 내부에 가한 음압을 수분 이상 지속하는 경우에도 이온 통로의 활성이 비활성화되는 현상은 나타나지 않았다. 이같은 음압에 의한 이온 통로 활성화 효과는 cell-attached patch에서도 동일하게 관찰되었다 (data not shown). 또한 동일한 음압 조건 하에서 patch 전압의 크기를 탈분극시켜주는 경우, 그에 비례하여 이온 통로의 열리는 정도 (NP_0)가 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 7). 이는 저삼투성 자극에 의해 활성화되는 이온 전류의 크기가 outward going rectification 현상을 보이는 것과 대응되는 결과라고 생각된다.

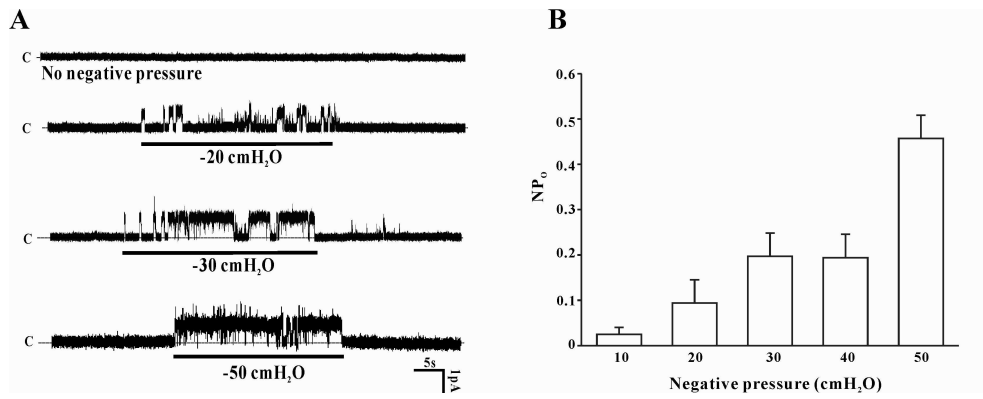


Figure 6. Relation between channel activity and the magnitude of negative pressure within microelectrode. Pipette and bath solution contained 140mM CsCl. Membrane potential was clamped at +40mV. Data was filtered at 1 KHz by 8-pole Bessel filter and digitized at 10 KHz. A: Single channel currents from an inside-out patch at different pipette negative pressure. c indicates closed state of current. B: Summarized NP₀ of stretch-activated channel at each negative pressure (n = 6).

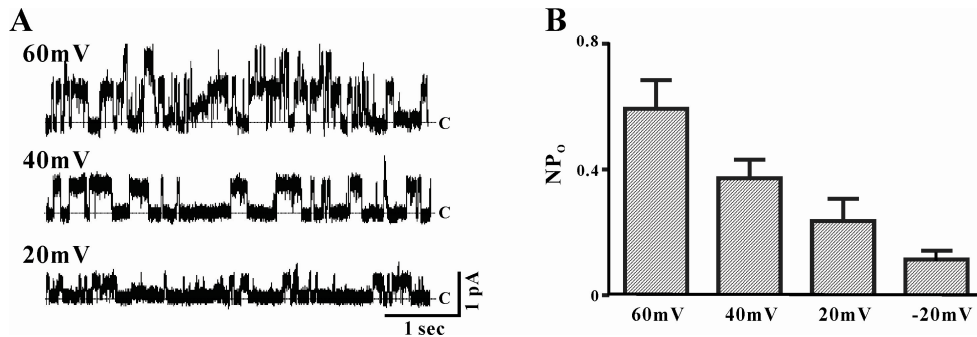


Figure 7. Voltage dependence of stretch activated channel. Pipette and bath solution contained 140mM CsCl. Negative pressure of -40 cmH₂O was applied within pipette. A: representative single channel recordings obtained from an inside-out patch at various membrane potentials. c indicates closed state of channel. B: Summarized NP_o of stretch-activated channel at each membrane potential (n = 6).

이같이 신전 자극에 의해 활성화되는 이온 통로의 투과도 특성을 확인하고자 하였다. 전극 내액과 관류액의 조성을 동일하게 한 상태 (140 CsCl)에서 이온 통로의 전도도는 25.4 ± 0.8 pS (n = 6)이었고, 역전전압 값은 -1.5 ± 0.1 mV이었다 (Figure 8A & D). 이후 관류액의 조성을 각각 140 NaCl, 140 KCl로 바꾼 상태에서 단일 통로의 전도도와 역전전압 값을 측정하였다. 이때 관류액의 Ca^{2+} 농도는 매우 낮게 유지함으로써 ($pCa < 8$) Ca^{2+} 의존성 K^+ 통로나 Cl^- 통로의 활성이 기록되는 것이 최소화되게 하였다. Figure 8에서 볼 수 있듯이 관류액의 이온 조성을 CsCl에서 NaCl이나 KCl로 변화시킨 경우에도 단일 통로의 전도도나 역전전압 값에는 유의한 차이를 관찰할 수 없었다 (상대적 투과도 값, $P_{Cs} : P_{Na} : P_K = 1 : 1.02 : 0.96$). 또한 관류액의 양이온 농도는 일정하게 유지한 상태에서 Cl^- 이온의 농도만을 140mM에서 50mM로 감소시킨 경우에도 단일 통

로의 전도도나 역전전압 값에 별다른 변화를 관찰할 수 없었다 (Figure 9). 이같은 결과는 자궁 평활근 세포에서 신전에 의해 활성화되는 이온 통로가 일가 양이온들이 자유롭게 지나다니는 비특이적 양이온 통로 (nonspecific cation channel)임을 시사한다.

한편, 세포 외액의 Ca^{2+} 농도를 제거한 용액으로 자궁평활근 절편을 관류하는 경우 자궁 평활근의 자발적 수축의 빈도가 느려지다가 결국에는 소실되는 현상을 관찰할 수 있었다 (unpresented result). 이같은 세포 외 Ca^{2+} 농도에 따른 자발적 수축 빈도의 변화가 SA 통로의 활성 변화와 연관되었는지를 확인하기 위해 관류액의 Ca^{2+} 농도를 달리한 상태에서 SA 통로의 활성 변화를 관찰하였다. 관류액의 Ca^{2+} 농도를 증가시키는 경우, 그에 비례하여 SA 통로의 활성이 증가하는 것이 관찰되었다 (Figure 10).

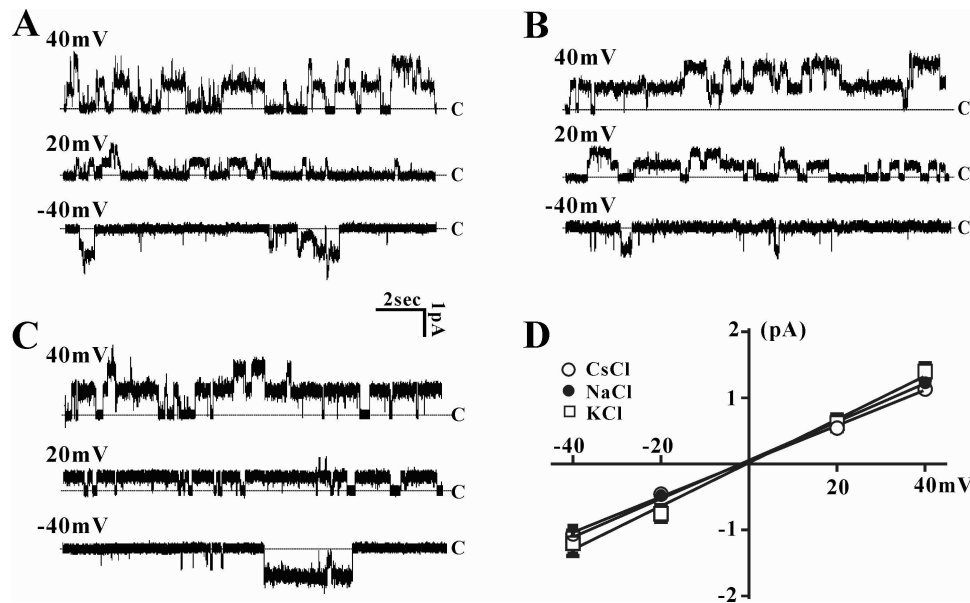


Figure 8. Ionic selectivity of stretch activated channel in uterine smooth muscle cells. Current-voltage relationship of channels in inside-out patch. Pipette solution contained 140 mM CsCl. Bath solution was 140 mM CsCl (A), NaCl (B), and KCl (C). D: Summarized current values at each membrane potential. Each data point is a mean \pm SD, (n = 6). The unit conductances and the reversal potential were slightly changed according to the composition of bath solutions. The value of unit conductance and reversal potential of 140mM CsCl was 27.1 pS and -1.6mV. The unitary conductances were changed to 29.1pS and 32.9pS during perfusion of 140mM NaCl and KCl solution, respectively. The reversal potentials were also changed to -2.0mV and -0.6mV during perfusion of NaCl and KCl solution, respectively.

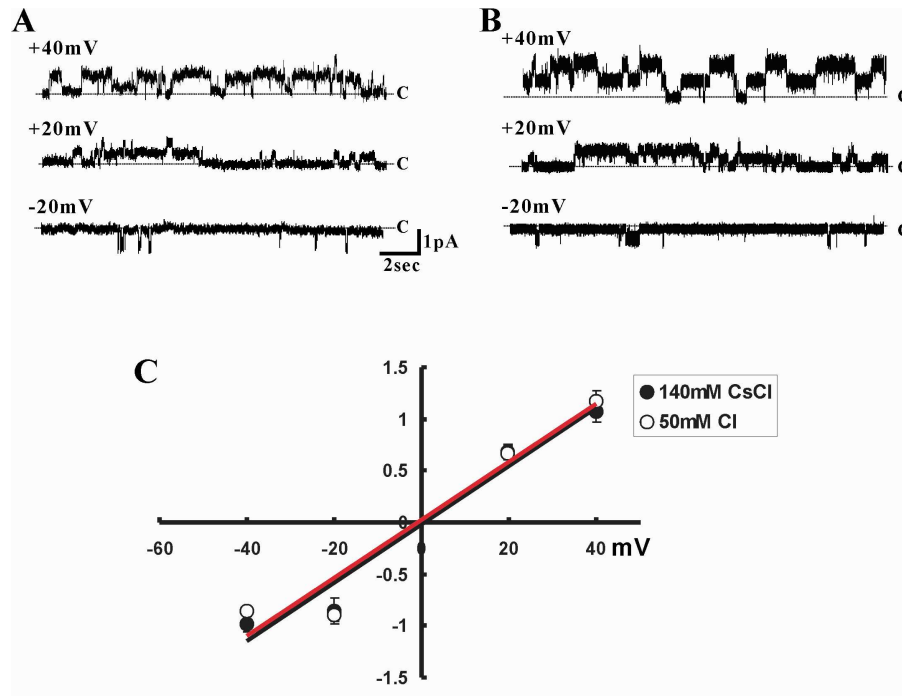


Figure 9. Anion permeability of stretch activated channel in uterine smooth muscle cells. Current-voltage relationship of channels in inside-out patch. Pipette solution contained 140 mM CsCl. Bath solution was 140 mM CsCl (A), 50CsCl + 90Cs-aspartate (B). C: Summarized current values at each membrane potential. Each data point is a mean \pm SD, (n = 6). The unit conductance and the reversal potential were insignificantly changed by reducing the bath concentration of Cl⁻.

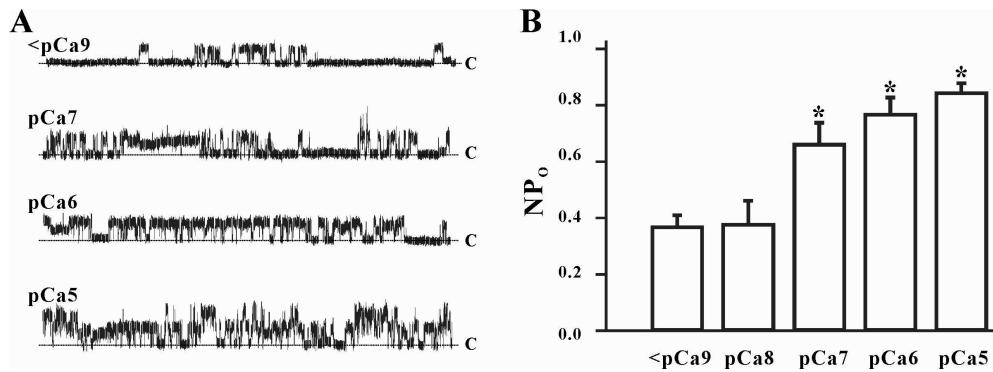


Figure 10. Intracellular Ca^{2+} dependent facilitation of SA channel activity. Pipette and bath solution contained 140mM CsCl. Negative pressure of $-20 \text{ cmH}_2\text{O}$ was applied within pipette. Membrane potential was clamped at $+40\text{mV}$. A: representative single channel recordings obtained from an inside-out patch at different Ca^{2+} concentration of perfusion solution. c indicates closed state of channel. B: Summarized NP_0 of stretch-activated channel at different Ca^{2+} concentration ($n = 6$).

IV. 고 찰

신전 자극이 자궁 평활근 절편의 자발적 수축 빈도에 미치는 효과와 단일 평활근 세포의 이온 전류 활성화에 미치는 효과를 조사한 본 실험을 통해 얻은 주요한 결과는 다음과 같다. 즉 1) 평활근 절편의 안정 시 길이를 달리한 경우, 길이가 증가할수록 자발적 수축 빈도 및 장력의 크기가 증가하였으며, 이 같은 신전의 효과는 SA 통로 차단제로 알려진 Gd^{3+} 이나 flufenamic acid에 의해 효과적으로 차단되었다. 또한 2) 저장성 용액을 관류시켜 자궁 평활근 세포막을 신전시킨 경우, flufenamic acid에 의해 그 크기가 억제되는 이온 전류가 활성화되었으며, 전극 내부에 음압을 가하여 세포막의 일부를 신전시킨 경우에서도 저장성 용액을 관류시킨 경우와 동일하게 이온 통로의 활성이 증가하는 것을 확인하였다. 3) 세포막의 신전 자극에 의해 활성화되는 이온 통로를 통해 일가 양이온은 통과하지만, 음이온은 통과하지 못하는 특성을 보였다. 또한 막전위가 탈분극되거나 혹은 세포 내 Ca^{2+} 농도를 높여주는 경우 통로의 활성이 유의하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이같은 실험 결과는 세포막의 신전에 의해 활성화되는 이온 통로가 자궁 평활근의 길이 변동에 따른 자발적 수축 빈도 결정에 중요한 역할을 함을 시사한다.

1. 자궁 평활근의 길이 변동과 자발적 수축 빈도 변화 사이의 관계

Figure 3에 나타난 바와 같이 자궁근 절편의 길이를 증가시킴에 따라, 그에 비례해서 자궁근의 자발적 수축 빈도가 증가하며, 이 같은 수축 빈도 증가 효과가 Gd^{3+} 과 같은 SA 통로 차단제²⁰에 의해 억제되는 Figure 4의 결과는 자궁 평활근 세포막에 SA 통로가 존재하고, 이의 활성 변화가 자궁 평활근의 자발적 수축 빈도 조절에 중요한 역할을 함을 시사한다. 다만

Gd³⁺의 경우 SA 통로에 대한 억제 효과 외에도 막전압 의존성 Ca²⁺ 통로에 대한 차단 효과를 갖고 있음이 이미 보고된 바 있으며,²¹ nifedipine과 같은 막전압 의존성 Ca²⁺ 통로 차단제 투여 시 자궁근의 자발적 수축 빈도가 감소하거나 또는 소실되므로²² 본 실험에서 관찰된 Gd³⁺에 의한 억제 효과가 SA 통로를 차단해서 나타난 것이 아니라 막전압 의존성 Ca²⁺ 통로를 억제해서 나타났을 가능성도 배제할 수 없다. 그러나 본 실험에서 사용한 Gd³⁺의 농도(<10 uM)가 막전압 의존성 Ca²⁺ 통로를 차단한다고 알려진 농도(~100 uM)에 비해 낮은 농도이고,²¹ 고농도 K⁺으로 자궁 평활근의 수축을 유도한 후 10 uM의 Gd³⁺을 처리하더라도 수축력의 크기에 변화가 없는 것으로 보아(unpresented result) 본 실험에서 사용한 Gd³⁺ 농도에서는 막전압 의존성 Ca²⁺ 통로의 억제 효과는 거의 없는 것을 알 수 있었다. 또한 Gd³⁺ 외에 비교적 선택적으로 SA 통로를 억제한다고 알려진 flufenamic acid²³를 처리한 경우에도 자궁 평활근 절편의 자발적 수축 빈도가 현저히 억제되는 본 실험의 결과는 (Figure 4) 자궁 평활근 세포막에 SA 통로가 존재하고, 이의 활성 변화가 자궁근의 자발적 수축 빈도 조절에 중요한 역할을 함을 시사한다.

2. 신전 자극에 의해 활성화되는 비특이적 양이온 통로

배양한 골격근 세포에서 처음으로 존재가 보고된 SA 통로는, 이후의 연구를 통해 평활근 세포를 포함한 여러 다양한 세포에 존재하는 것이 확인되었다.¹⁵⁻¹⁸ 신전 자극에 의해 SA 통로가 활성화되는 경우, Na⁺과 같은 양이온이 세포 내로 유입됨으로써 세포막 전위의 탈분극이 유도되고, 이 결과 Ca²⁺ 통로가 활성화됨으로써 세포 기능의 변화가 유발됨은 잘 알려져 있다.¹⁸ Figure 5에서 볼 수 있듯이 분리한 자궁 평활근 세포를 저삼투성 용액에 노출시켜 세포막의 신전을 유도한 경우, 외편향성 이온 전류

(outward going rectifier current)가 활성화되는 것을 관찰할 수 있었으며, 이같이 신전에 의해 활성화된 이온 전류가 0mV에서 역전되는 것으로 보아 비특이적 양이온 전류의 특성을 갖고 있음을 알 수 있었다. 그런데 저삼투성 용액에 의해 활성화되는 이같은 이온 전류가 SA 통로가 활성화되어 나타난 것이 아니라 자궁 평활근 세포막에 존재한다고 이미 보고된 바 있는 누설전류(leakage current)나 과분극 활성화 전류(hyperpolarization-activated current)와 같은 비특이적 양이온 전류의 활성이 저삼투성 자극에 의해 증가되어 나타났을 가능성도 배제할 수 없다. 그러나 leakage current의 경우 막전위 변화에 따라 직선적으로 전류의 크기가 변화하고, hyperpolarization-activated current의 경우 막전위가 과분극될 때 오히려 그 크기가 증가하는 특성을 보이므로,^{24,25} 본 실험에서 관찰된 이온 전류의 막전압 의존 특성과는 차이가 있다. 또한 hyperpolarization-activated current의 경우 Na^+ 과 K^+ 은 잘 통과하지만 Cs^+ 이온에 의해서는 오히려 전류가 소실되는 특성을 보이는데 반해,²⁵ 신전에 의해 활성화되는 이온 전류의 경우 Cs^+ 에 대한 투과도가 Na^+ 과 거의 유사한 값을 보이고 있다. 따라서 본 실험에서 관찰된 저삼투성 자극에 의해 유발되는 이온 전류는 기존에 자궁평활근에 존재한다고 보고된 비특이적 양이온 전류가 저삼투성 자극에 의해 활성화되어 나타난 것이 아니라 SA 통로가 활성화되어 나타났음을 알 수 있다. 이 같은 결과는 단일 통로 고정법을 통한 실험을 통해서도 확인할 수 있었다. 즉 전극 내부에 음압을 가하여 세포막을 신전시킨 경우, 27pS의 전도도를 갖는 이온 통로가 활성화되는 것을 관찰할 수 있었으며, 동일한 크기의 음압 조건에서 막전위가 탈분극될수록 이온 통로의 활성이 증가하였다. 이 같은 막전압 의존 특성은 저삼투성 자극에 의해 활성화되는 이온 전류의 전류-전압 관계와 일치하는 결과라고 생각된다. 또한 이 통로를 통해 Na^+ , K^+ , Cs^+ 과 같은 1가 양이온들이 거의 유사한 정도

($P_{Cs} : P_{Na} : P_K = 1 : 1.02 : 0.96$)로 투과하는데, 이같은 투과도 특성은 심방근이나 뇌동맥 평활근 세포에서 보고된 SA 통로의 특성과 유사하였다.²⁶⁻⁷

한편, 최근의 분자생물학적 연구를 통해 신전자극에 의해 활성화되는 이온 통로가 transient receptor potential (TRP) channel 그룹에 속하는 것이 알려졌으며,²⁸ TRP 그룹에 속하는 이온 통로 중에서 특히 TRPC6와 TRPM4 통로가 세포막의 신전자극에 의해 활성화되는 것이 보고되었다.²⁹ TRPC6 통로의 경우, 거의 모든 부위의 혈관 평활근 세포에서 발견되고 있으며, 자궁평활근 세포에서도 이의 존재가 보고되었다.³⁰ TRP6 통로의 전도도는 30pS 내외이며, Gd^{3+} 에 의해 통로가 차단되고, 신전 자극이나 막전압의 탈분극 시 통로의 활성이 증가하는 현상 등³¹은 본 실험에서 얻은 SA 통로의 특성과 유사하다. 그런데 Figure 11에서 나타난 바와 같이 세포 내 Ca 농도 증가시 SA 통로의 활성이 현저히 증가하는데, 이는 기존에 보고된 TRP6 통로의 특성과는 일치하지 않는 결과이다. 반면에 TRPM4 통로의 경우 뇌혈관 평활근 세포에 많이 분포함이 보고되었는데, 이의 전도도는 25pS 내외이며, 탈분극이나 신전자극, 그리고 세포 내 Ca^{2+} 농도 증가에 반응해서 통로의 활성이 증가하는 것이 보고되었다.^{27,32} 현재까지 자궁평활근 세포에서 TRPM 통로가 발현되어 있는지에 대한 분자생물학적 보고는 없으나 RT-PCR을 이용한 본 연구자의 실험에서 TRPM2와 TRPM4가 자궁평활근 세포에서 발현된 것을 확인할 수 있었다(unpresented result). 이같은 결과는 임신한 쥐 자궁평활근에서 신전자극에 의해 활성화되는 이온 통로가 TRPM4 통로일 가능성을 시사한다. 다만 이 같은 가설을 확인하기 위해선 antisense를 이용하여 TRPM4의 발현을 차단한 상태에서 신전에 의한 자궁근의 수축 빈도 증가 현상이 소실되는지를 확인할 필요가 있다. 또한 신전 자극이 어떤 경로를 통해 TRPM4의 활성을 증가시키는지에 대해서도

아직 불명확하다. 따라서 이들 과제에 대해선 차후의 연구에서 다루고자 한다.

3. 신전 자극에 의해 활성화되는 이온 통로의 생리적 역할

임신 자궁 평활근에서 자발적 수축이 유발되는 정확한 기전에 대해서는 아직 불명확하다. 다만 유리 미세전극을 이용한 막전위 측정 실험 등을 통해 이완기 동안 자궁 평활근 세포막 전위의 자발적인 탈분극이 일어나고, 이 같은 탈분극이 역치에 도달하면 활동전위가 형성됨으로써 수축이 유발되는 것이 여러 연구자들에 의해 보고된 바 있다.^{12,14} 본 실험을 통해 확인된 SA 통로는 비특이적 양이온 통로의 특성을 갖고 있으므로 이의 활성화 변화 시 세포 내로 유입되는 양이온의 양을 변동시킴으로써 평활근 세포막 전위가 탈분극되는 속도와 활동전위가 생성되는 빈도에 영향을 끼칠 수 있다. 정상인의 경우 임신 말기에 도달하면, 자궁 평활근의 길이가 slack length의 약 2.5배까지 증가하므로,⁵ 이에 따른 SA 통로의 활성화 증가에 의해 자궁 평활근 세포막 전위의 탈분극 속도가 증가하여 자발적 수축 빈도가 빨라지게 된다. 이같은 자궁근의 길이 변동에 의한 효과는 다태아 임신이나 양수과다증 임신과 같이 자궁의 과도한 신전이 유발된 경우에서 관찰되는 조기분만 현상^{6,7}에도 기여할 것으로 생각한다. 한편 SA 통로의 활성화가 세포막의 신전 외에 세포 내 Ca^{2+} 농도에 의해서도 조절된다는 본 실험의 결과는 oxytocin과 같이 자궁 평활근 세포 내 Ca^{2+} 농도를 증가시키는 작용을 갖고 있는 agonist 사용 시 관찰되는 자궁근의 자발적 수축 빈도 증가 현상에 SA 통로의 활성화 증가가 관여할 것이라 생각된다.

V. 결 론

신전에 의해 자궁 평활근의 자발적 수축 빈도가 증가하는 기전을 규명하기 위해 자궁 평활근 절편을 이용한 장력 실험과 분리한 자궁 평활근 세포를 이용한 whole cell 및 inside-out patch clamp 실험을 통해 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 자궁 평활근의 자발적 수축 빈도는 자궁근의 신전 정도에 비례하여 증가하였으며, SA 통로 차단제 투여 시, 투여 농도에 비례하여 자발적 수축 빈도가 감소하는 것을 관찰할 수 있었다.
2. 저삼투성 용액으로 자궁평활근 세포를 관류시켜 세포의 팽창을 유도한 경우, 이온 전류가 발생하였으며, 이같은 효과는 SA 통로 차단제인 flufenamic acid 처리시 억제되었다.
3. Inside-out patch 상태에서 전극 내부에 음압을 가하여 patch membrane을 신전시키는 경우 SA 통로가 활성화되었으며, 이 통로의 활성 정도는 전극 내부에 가한 음압의 크기와 막전압의 탈분극 정도에 비례하여 증가하였다.
4. 열려 있는 SA 통로를 통해서 Na^+ , K^+ , Cs^+ 과 같은 일가 양이온들이 거의 동일한 투과도 특성을 보였으며, Cl^- 와 같은 음이온은 통과하지 못하였다.
5. 세포 내액의 Ca^{2+} 농도 증가시 SA 통로의 활성이 현저히 증가하였다.

이상의 실험 결과로 볼 때 자궁 평활근 세포막에 신전 자극에 반응하여 그의 활성이 증가하는 SA 통로가 존재하며, 이같은 SA 통로의 활성 변화가 임신 말기에서 관찰되는 자궁 평활근의 자발적 수축 빈도 증가를 초래

하는 중요한 기전의 하나라고 생각된다. 따라서 SA 통로의 활성 조절 시 다태아 임신이나 양수과다증 환자와 같이 자궁의 과다 신전 시에 조기 분만을 효과적으로 억제할 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Bengtsson B. Factors of importance for regulation of uterine contractile activity. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* 1982;108:13-6.
2. Olson DM, Mijovic JF, Sadowsky DW. Control of human parturition. *Semin Perinatol* 1995;19:52-63.
3. Wray S. The role of mechanical and hormonal stimuli on uterine involution in the rat. *J Physiol* 1982;328:1-9.
4. Wray S. Uterine contraction and physiologic mechanism of modulation. *Am J Physiol* 1993;264:C1-C18.
5. Kasai Y, Tsutsumi O, Taketani Y, Endo M, Lino M. Stretch-induced enhancement of contractions in uterine smooth muscle of rats. *J Physiol* 1995;486:373-84.
6. Moutquin JM. Classification and heterogeneity of preterm birth. *Int J Obst Gynecol* 2003;110:30-3.
7. Smith R. Parturition. *N Engl J Med* 2007;356:271-83.
8. Bozler E. The response of smooth muscle to stretch. *Am J Physiol* 1947;149:299-301.
9. Bulbring E. Correlation between membrane potential, spike discharge and tension in smooth muscle. *J Physiol* 1955;128:200-21.
10. Burnstock G, Prosser CL. Responses of smooth muscle to quick stretch; relation of stretch to conduction. *Am J Physiol* 1960;198:921-5.

11. Kleinhaus AI & Kao CY. Electrophysiological actions of oxytocin on the rabbit myometrium. *J Gen Physiol* 1969;53:758-80.
12. Kuriyama J, Suzuki H. Changes in electrical properties of rat myometrium during gestation and following hormonal treatments. *J Physiol* 1976;260:315-33.
13. Sanborn BM. Relationship of ion channel activity to control of myometrial calcium. *J Soc Gynecol Investig.* 2000;7:4-11.
14. Parkington HC, Coleman HA. Excitability in the uterine smooth muscle. "The endocrinology of parturition. Basic science and clinical application" Ed by Smith R. *Front Horm Res.* Basel Karger, 2001; pp179-200.
15. Guharay F, Sachs F. Stretch-activated single ion channel currents in tissue-cultured embryonic skeletal muscle cells. *Am J Physiol* 1984;262:C1083-C1088.
16. Ohmori H. Mechanoelectrical transducer has discrete conductances in the chick vestibular hair cell. *PNAS* 1984;81:1888-91.
17. Yang XC, Sachs F. Stretch activated channels in several tissues. *Biophysical J.* 1987;51:252a.
18. Wellner NC, Isenberg G. Stretch effects on whole cell currents of guinea pig urinary bladder myocytes. *J Physiol* 1994;480:439-48.
19. Hamil OP, Marty A, Neher EL, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflu Arch* 1981;391:85-100.

20. Yand XC, Sachs F. Block of stretch-activated ion channels in xenopus oocytes by gadolinium and calcium ions. *Science* 1989;243:1068-71.
21. Lacampagne A, Argibay F, Garnier J, Guennec JY. The stretch-activated ion channel blocker gadolinium also blocks L-type calcium channels in isolated ventricular myocytes of the guinea pig. *biochimica et Biophysica Acta* 1994;1191:205-8.
22. Coleman HA, Hart JDE, Tonta MA, Parkington HC. Changes in the mechanism involved in uterine contraction during pregnancy in guinea pig. *J Physiol* 2000;523:785-98.
23. Alexander SPH, Mathie A, Peters JA. Transient receptor potential (TRP). *Br J Pharmacol* 2008;153:S116-21.
24. Miyoshi H, Yamaoka K, Garfield R, Ohama K. Identification of a non-selective cation channel current in myometrial cells isolated from pregnant rats. *Pflu Arch Eur J Physiol* 2004;447:457-64.
25. Okabe K, Inoue Y, Kawarabayashi T, Kajiya H, Okamoto F, Soeda H. Physiological significance of hyperpolarization-activated inward currents in smooth muscle cells from the circular layers of pregnant rat myometrium. *Pflu Arch Eur J Physiol* 1999;439:76-85.
26. Zhang YH, Youm JB, Sung HK, Lee SH, Ryu SY, Lee SH, et al. Stretch-activated and background non-selective cation channels in rat atrial myocytes. *J Physiol* 2000;523:607-19.
27. Earley S, Waldron BJ, Brayden JE. Critical role for transient

- receptor potential channel TRPM4 in myogenic constriction of cerebral arteries. *Circ Res* 2004;95:922-9.
28. Wess J. Cation channels of the transient receptor potential superfamily: their role in physiological and pathophysiological processes of smooth muscle cells. *Pharmacology and Therapeutics* 2006;112:744-60.
29. Inoue R, Jensen LJ, Shi J, Morita H, Hishida M, Honda A, et al. Transient receptor potential channels in cardiovascular function and disease. *Circ Res* 2006;99:119-31.
30. Dalrymple A, Slater DM, Poston L, Tribe RM. Molecular identification and localization of Trp homologues, putative calcium channels, in pregnant human uterus. *Mol Hum reprod* 2002;8:946-51.
31. Spassova MA, Hewavitharana T, Xu W, Soboloff J, Gill DL. A common mechanism underlies stretch activation and receptor activation of TRPC6 channels. *PNAS* 2006;103:16586-91.
32. Nilius B, Prenen J, Tang J, Wang C, Owsianik G, Janssens A, et al. Regulation of the Ca²⁺-sensitivity of the nonselective cation channel TRPM4. *J Biol Chem* 2005;280:6423-33.

Abstract

Mechanism of stretch-induced enhancement of spontaneous
uterine
contraction in pregnant rat uterus

Jeong-Yeon Kim

Department of medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Dong-Jae Cho)

Although the exact mechanisms that initiate parturition have been still uncertain, the stretching of the myometrium as a result of fetal growth has been considered as one of key event in the initiation of labor. This hypothesis was supported by the reports that the labor starts earlier with twins, macrosomia or polyhydramnios, which are all related to the increased myometrial stretching due to multiple or large fetus or excess amniotic fluid. The stretch of smooth muscle can activate an stretch-activated non-selective cation channels (SACC). However, the direct evidence for the presence of SACC in uterine smooth muscle has not yet been reported. In this study, we investigate whether the stretch can activate the SACC in pregnant rat myometrial cells using patch clamp technique and evaluate the involvement of SACC in the regulation of spontaneous uterine contraction using tension measurement.

Increasing the initial length of uterine strips fastened the spontaneous uterine contraction frequency, which was suppressed by applicaiton of Gd^{3+} or flufenamic acid. Perfusion of hypo-osmotic solution induced outward going rectifier current, which was inhibited by bath application of flufenamic acid. The application of negative pressure within a pipette in cell-attached or inside-out pathch mode

induced the opening of ion channels, which has single channel conductance of ~ 27 pS in symmetrical Cs^+ solution, and activity of these ion channels are disappeared after removing of negative pressure. Increasing the negative pressure from -10 to -60 cm H_2O increased channel activity from 2.4% to 47.5%. There was no significant difference in the stretch-induced activation of ion channel between cell-attached and inside-out patch mode. The cation selectivity of this channel was investigated using inside-out patch mode. The channels shows similar permeability to both Na^+ , K^+ and Cs^+ ions, and the permeability to Ca^{2+} is lower than monovalent cations. Increasing the bath Ca^{2+} concentration in inside-out patch mode significantly enhanced the channel activity at same negative pressure (0.31 at $< \text{pCa}9$ vs 0.76, at $\text{pCa}6$)

From these result, it may be concluded that stretch can directly activate the SACC in pregnant rat uterine smooth muscle cells, and activation of SACC might contribute to the development of spontaneous contraction during labor.

Key Words : uterine smooth muscle cells, stretch-activated nonselective cation channel, spontaneous uterine contraction, flufenamic acid.